



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> : C08G 61/12, G01N 27/00	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 95/29199 (43) Date de publication internationale: 2 novembre 1995 (02.11.95)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR95/00536 (22) Date de dépôt international: 24 avril 1995 (24.04.95) (30) Données relatives à la priorité: 94/05064                      22 avril 1994 (22.04.94)                      FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): BIO MERIEUX [FR/FR]; F-69280 Marcy-l'Etoile (FR). (72) Inventeur; et (75) Inventeur/Déposant (US seulement): GARNIER, Francis [FR/FR]; 17, villa Rémy, F-94500 Champigny-sur-Marne (FR). (74) Mandataire: MAUREAU, Philippe; Cabinet Germain et Mau- reau, Boîte postale 3011, F-69392 Lyon Cédex 03 (FR).	(81) Etats désignés: CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i>	
(54) Title: ELECTRICALLY CONDUCTIVE ELECTROACTIVE FUNCTIONALISED CONJUGATED POLYMERS, AND USES THEREOF		
(54) Titre: POLYMERES CONJUGUES FONCTIONNALISES ELECTRIQUEMENT CONDUCTEURS ET ELECTROACTIFS, ET UTILISATIONS		
<div style="text-align: center;"> </div>		
(57) Abstract		
<p>Electrically conductive electroactive conjugated polymers, and uses thereof, said polymers including at least one functional group covalently bonded to a first biological molecule or anti-ligand of formula (II), wherein n is an integer other than zero and i is an integer from 2 to n-1, and each of R<sup>1</sup>, R<sup>i</sup> and R<sup>n</sup>, which are the same or different, is H or a functional group covalently bonded or bondable to a first biological molecule or anti-ligand.</p>		
(57) Abrégé		
<p>L'invention a pour objet des polymères conjugués, électriquement conducteurs, et électroactifs et leurs utilisations, ces polymères comprenant au moins un groupe fonctionnel lié, par covalence, à une première molécule biologique ou anti-ligand répondant à la formule (II) dans laquelle n est un nombre entier non nul et i est un nombre entier variant de 2 à n-1, et R<sup>1</sup>, R<sup>i</sup>, R<sup>n</sup>, identiques ou différents, représentent chacun H ou un groupe fonctionnel susceptible de se lier, ou lié, par covalence, à une première molécule biologique ou anti-ligand.</p>		

# **UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Brésil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

POLYMERES CONJUGUES FONCTIONNALISES ELECTRIQUEMENT  
CONDUCTEURS ET ELECTROACTIFS, ET UTILISATIONS

Les polymères conjugués, tels que polypyrroles, polythiophènes, polyanilines, polyphénylènes, et leurs dérivés sont connus pour leur caractère électroactif, largement décrit dans des ouvrages de revue tel que "Handbook of Organic Conducting Polymers (T.J. Skotheim Editeur, Marcel Dekker, New York, 1986). Ces polymères sont obtenus sous forme de film sur électrode, sous forme de films auto-supportés ou encore sous forme de composite lorsqu'alliés à un polymère polycationique ou polyanionique et se comportent comme des électrodes organiques, qui se chargent suivant un processus d'oxydation anodique, par insertion d'ions du milieu électrolytique. Ce processus électrochimique est réversible, la réduction provoquant l'expulsion des ions de ce polymère conjugué ou du composite électroactif.

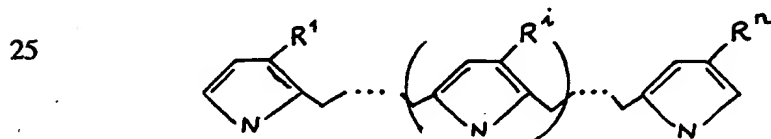
Une seconde génération de polymères conjugués a ensuite été décrite dans la littérature, obtenue par le greffage covalent, sur les unités monomères des polymères, de groupes fonctionnels, capables d'apporter une fonction additionnelle à ces polymères conjugués électroactifs. A titre d'exemple, des complexes métalliques électrocatalytiques ont été greffés sur les unités monomères du polypyrrole, des macrocycles complexants spécifiques ont été greffés sur les chaînes de polypyrrole ou de polythiophène pour la reconnaissance de cations dans un milieu électrolytique, des groupes chiraux ont été greffés sur des polythiophènes pour la reconnaissance d'anions optiquement actifs. L'ensemble de ces voies de fonctionnalisation a fait également l'objet de mises au point détaillées dans la littérature (F. Garnier, Angew. Chemie, 1989, 101, 529; A. Deronzier, J.C. Moutet, Acc. Chem. Res. 1989, 22, 249; J. Roncali, Chem Rev., 1992, 92, 711).

Ces dernières années des auteurs se sont intéressés à l'utilisation de polymères conducteurs fonctionnalisés pour le développement de capteurs d'analytes, notamment à but diagnostique. Toutefois, comme indiqué dans la demande de brevet EP 0 314 009, il était communément admis par la communauté scientifique que des polymères de pyrrole substitués au niveau soit de l'atome d'azote, soit directement au niveau des atomes de carbone du cycle pyrrole n'étaient pas de bons candidats pour le développement de capteurs d'analytes du fait notamment de la perte de conductivité desdits polymères quand des groupements fonctionnels sont introduits sur le cycle hétéroatomique. Pour résoudre ce problème les auteurs de cette demande de brevet avaient donc envisagé d'utiliser des polymères 2,5-di(2-thienylpyrrole) sur lesquels

était greffée en position 3 du noyau pyrrole une partie réactive à laquelle pouvait être liée par covalence une molécule organique. Il convient toutefois de noter qu'en raison de l'hydrophobicité des noyaux thiophènes les polymères décrits ne peuvent être conducteurs et électroactifs dans les milieux aqueux et de ce fait ne semblent être adaptés pour la détection et/ou la caractérisation d'un analyte dans un échantillon biologique (voir J. Roncali et al., Chem. Comm., 1986, page 783 et G. Tourillon et al., Electronal.Chem., 161, 407, 1984).

On a maintenant découvert de manière tout à fait surprenante et à l'encontre de ce qui était jusque là admis par les spécialistes que la conductivité et l'électroactivité de polypyrroles sont conservées à la condition que le greffage d'un groupement fonctionnel soit effectué en position 3 ou 4 sur le noyau pyrrole à l'aide d'un agent de fonctionnalisation qui permet l'éloignement de la fonction visée par rapport au noyau pyrrole. A l'extrémité libre du groupement fonctionnel est lié par covalence un anti-ligand sans que soient modifiées les propriétés précitées du polymère. De tels polymères fonctionnalisés n'ont à ce jour jamais été décrits et se sont révélés être parfaitement appropriés comme capteurs d'un ligand biologique. Par ailleurs, les polypyrroles se révèlent être des polymères intéressants du fait de leur biocompatibilité. Enfin, les polypyrroles ainsi fonctionnalisés permettent de réaliser des polymères électroactifs et conducteurs d'épaisseurs importantes (jusqu'à plusieurs millimètres), ce qui autorise une grande densité de sites fonctionnels et améliore d'autant la sensibilité.

L'invention a donc pour objet un polymère fonctionnalisé, électriquement conducteur et électroactif qui répond à la formule I :



dans laquelle:

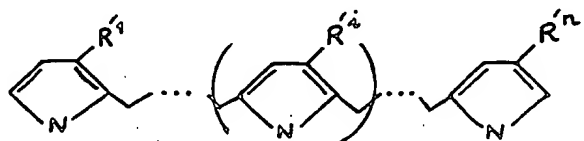
- 30 \*n est un nombre entier non nul et i est un nombre entier variant de 2 à n-1, et  
 \*R<sup>1</sup>, R<sup>i</sup>, R<sup>n</sup>, identiques ou différents, représentent chacun H ou un groupe fonctionnel susceptible de se lier, par covalence, à une première molécule biologique ou anti-ligand, et en ce que ledit polymère présente une conductivité et une électroactivité sensiblement du même ordre que celle du polymère conjugué non fonctionnalisé correspondant, c'est-à-dire du polymère de formule I correspondant,  
 35 dans laquelle R<sup>1</sup>, R<sup>i</sup>, R<sup>n</sup> représentent chacun H.

Plus particulièrement, le ou les groupement(s) fonctionnel(s) sont indépendamment choisis dans l'ensemble de groupes fonctionnels suivants :

- $Y_p-C-X$  où X représente H, OH, un radical O-alkyle inférieur substitué ou non, un halogène, notamment Cl;  $Y_p-NHZ$ , Z représentant H ou un radical alkyle;  $Y_p-NH-CO-CF_3$ ;  $Y_p-X$  où X répond à la définition ci-dessus, p étant un nombre entier de préférence égal à 0, 1 ou 2 ;  $-Si(alkyle)_3$ ,  $-Si(alkoxy)_3$ , ou un groupement ester activé tel que le N-hydroxy-succinimide.

Préférentiellement, Y représente un groupement choisi parmi les alkyles ayant de 1 à 5 atomes de carbone, les alkoxyes ayant de 1 à 5 atomes de carbone, les polyéthers répondant à la formule générale  $(CH_2-CH_2-O)_m-(CH_2)_{m'}$ , m représentant un nombre entier variant de 1 à 3 et m' un nombre entier égal à 1 ou 2.

L'invention a également pour objet un polymère conjugué, électriquement conducteur, et électroactif comprenant au moins un groupe fonctionnel lié, par covalence, à une première molécule biologique ou anti-ligand répondant à la formule II :



20

dans laquelle :

- \* n est un nombre entier non nul et i est un nombre entier variant de 2 à n-1, et
- \*  $R^1$ ,  $R^i$ ,  $R^n$ , identiques ou différents, représentent chacun H ou un groupe fonctionnel susceptible de se lier, ou lié, par covalence, à une première molécule biologique ou anti-ligand.

Avantageusement, les groupes fonctionnels liés à une molécule biologique ou ligand sont choisis, avant réaction avec cette dernière, dans l'ensemble des groupes fonctionnels suivant :

- $Y_p-C-X$  où X représente H, OH, un radical O-alkyle inférieur substitué ou non, un halogène, notamment Cl;  $Y_p-NHZ$ , Z représentant H ou un radical alkyle;  $Y_p-NH-CO-CF_3$ ;  $Y_p-X$  où X répond à la définition ci-dessus, p étant un nombre entier de préférence égal à 0, 1 ou 2 ;  $-Si(alkyle)_3$ ,  $-Si(alkoxy)_3$ , ou un groupement ester activé tel que le N-hydroxy-succinimide.

En particulier, les groupes fonctionnels liés à une molécule biologique sont identiques et consistent, avant réaction avec la ou les première(s) molécule(s) biologique(s), en  $-(CH_2)-COOH$ , lesdites premières molécules biologiques ou anti-

35

ligands étant choisies parmi les peptides ou dérivés de peptides notamment Gly-Phe, Phe-Pro, Phe-HEA-Pro, et parmi les polynucléotides tels que l'oligonucléotide de séquence: CCTAAGAGGGAGTG.

Un autre objet de l'invention est l'utilisation d'un polymère conjugué tel que  
5 défini précédemment pour détecter ou doser, *in vitro* ou *in vivo*, une seconde molécule biologique ou ligand, différente de l'anti-ligand et interagissant spécifiquement avec ce dernier, la détection et/ou le dosage dudit ligand étant effectué par observation et/ou mesure d'une différence de potentiel ou d'une variation de courant entre le polymère conjugué non lié au ligand et le polymère conjugué lié  
10 au ligand.

En particulier, les polymères de l'invention sont utilisés pour détecter et/ou doser une enzyme, telle qu'une enzyme protéolytique notamment la carboxypeptidase A, ou un polynucléotide ou pour extraire, *in vitro* ou *in vivo*, une seconde molécule biologique ou ligand, différente de l'anti-ligand et interagissant spécifiquement avec  
15 ce dernier.

Dans un mode de réalisation de l'invention, le polymère conjugué est déposé sur un substrat conducteur, tel que le métal ou un dérivé du carbone, ou sous la forme d'un film auto-supporté.

Enfin, l'invention concerne une électrode et un film auto supporté constitués  
20 d'un substrat conducteur tel qu'un métal ou un dérivé de carbone et d'un polymère tel que défini précédemment.

Dans un mode de réalisation, l'anti-ligand est spécifique du ligand ou molécule cible. L'anti-ligand est notamment choisi pour former un complexe anti-ligand/molécule cible. A titre d'exemple, le complexe peut être notamment représenté  
25 par tout couple peptide/anticorps, anticorps/haptène, hormone/récepteur, les hybrides polynucléotide/polynucléotide, polynucléotide/acide nucléique ou analogues.

Le terme "polynucléotide" tel qu'utilisé dans la présente invention désigne un enchaînement d'au moins cinq désoxyribonucléotides ou ribonucléotides comprenant éventuellement au moins un nucléotide modifié, par exemple un nucléotide  
30 comportant une base modifiée telle que l'inosine, la méthyl-5-désoxycytidine, la diméthylamino-5-désoxyuridine, la désoxyuridine, la diamino-2,6-purine, la bromo-5-désoxyuridine ou tout autre base modifiée permettant l'hybridation. Ce polynucléotide peut également être modifié au niveau de la liaison internucléotidique (comme par exemple les liaisons phosphorothioate, H-phosphonate, alkyl-  
35 phosphonate), au niveau du squelette comme par exemple les alpha-oligonucléotides

(FR 2 607 507) ou les PNA (M. Egholm et al., J. Am. Chem. Soc., (1992), 114, 1895-1897). Chacune de ces modifications peut être prise en combinaison.

Le terme "peptide" tel qu'utilisé dans la présente demande signifie notamment tout peptide d'au moins deux acides aminés, notamment protéine ou fragment de protéine, oligopeptide,, extrait, séparé ou substantiellement isolé ou synthétisé, notamment ceux obtenus par synthèse chimique ou par expression dans un organisme recombinant; tout peptide dans la séquence duquel un ou plusieurs acides aminés de la série L sont remplacés par un acide aminé de la série D, et vice-versa; tout peptide dont l'une au moins des liaisons CO-NH, et avantageusement toutes les liaisons CO-NH de la chaîne peptidique est (sont) remplacée(s) par une (des) liaisons NH-CO; tout peptide dont l'une au moins des liaisons CO-NH et avantageusement toutes les liaisons CO-NH est ou sont remplacée(s) par une ou des liaison(s) NH-CO, la chiralité de chaque résidu aminoacyle, qu'il soit impliqué ou non dans une ou plusieurs liaisons CO-NH sus-mentionnées, étant soit conservée, soit inversée par rapport aux résidus aminoacyles constituant un peptide de référence, ces composés étant encore désignés immunorétroïdes, un mimotope.

De nombreuses classes de peptides peuvent être greffées, comme le montre la liste non exhaustive ci après: hormones adrénocorticotropiques ou leurs fragments; analogues d'angiotensines ou leurs inhibiteurs (composants du système renine-angiotensine qui régulent l'hypertension rénale); peptides natriurétiques; bradykinine et ses dérivés peptidiques; peptides chimiotactiques; dynorphine et ses dérivés; endorphines ou analogues; encéphalines ou leurs dérivés; inhibiteurs d'enzymes (tels que protéases); fragments de fibronectine et dérivés; peptides gastrointestinaux; peptides associés au largage d'hormones de croissance; neurotensines et analogue; peptides opioïdes; oxytocine, vasopressine, vasotocine et dérivés; protéines kinases.

Les peptides ou les polynucléotides possèdent une activité biologique élevée, et sont connus pour contrôler de nombreuses fonctions biologiques (A.S. Dutta, Advances in Drug Research, B. Testa Editeur, Academic Press, New York, 1991, 21, 145).. Les peptides montrent par exemple un potentiel thérapeutique très important en tant que récepteur agoniste ou antagoniste, en tant qu' inhibiteurs très puissants qui se lient de façon forte à des enzymes, principe sur lequel est basée la chromatographie dite d'affinité. Par ailleurs, les polynucléotides peuvent, par réaction d'hybridation sélective avec d'autres nucléotides ou fragments d'acides nucléiques cibles, donner lieu à des phénomènes de reconnaissance intéressants, permettant notamment le développement de nouveaux capteurs de gènes. Ainsi, pour détecter et/ou doser un acide nucléique ou un fragment d'acide nucléique cible, un

polymère fonctionnalisé lié au moins partiellement à un polynucléotide antiligand est mis en contact avec un échantillon susceptible de contenir la cible, puis on détecte la réaction d'hybridation si elle a eu lieu, soit directement par mesure d'une différence de potentiel ou de variation de courant entre le polymère non lié et le polymère lié  
5 ayant réagi avec la cible, soit indirectement par la même mesure que précédemment, mais à l'aide d'un polynucléotide supplémentaire de détection susceptible de réagir avec la cible, ledit polynucléotide supplémentaire étant de préférence contigu au polynucléotide antiligand et marqué avec une molécule électroactive.

Le terme "anticorps" tel qu'utilisé dans la présente demande signifie tout  
10 anticorps monoclonal ou polyclonal, tout fragment d'undit anticorps tel que fragment Fab, Fab'2 ou Fc, ainsi que tout anticorps obtenu par modification ou recombinaison génétique.

La fonctionnalisation du polypyrrole en position 3 ou 4 du cycle pyrrole peut être effectuée, soit sur les unités monomères avec étape de polymérisation  
15 subséquente, soit sur les unités monomères d'un polymère synthétisé au préalable. Tout agent de fonctionnalisation approprié peut être utilisé, à la condition qu'il comprenne au moins une fonction réactive susceptible de réagir avec les atomes 3 et/ou 4 du noyau pyrrole. L'agent de fonctionnalisation peut ainsi être un agent unifonctionnel, à la condition qu'après l'étape de greffage sur le noyau pyrrole une  
20 nouvelle fonction réactive soit introduite pour réaction subséquente avec l'anti-ligand, soit plurifonctionnel tel que des agents bifonctionnels et en particulier homo ou hétéro bifonctionnel. A titre d'exemple, l'agent de fonctionnalisation est choisi parmi les chaînes alkyles ou alkoxyes ou polyéthers substituées ou non et terminées par un groupe portant une fonction réactive. La fonction réactive est notamment représentée  
25 par un groupement fonctionnel tel que groupement carboxylique, hydrazide, amine, nitrile, aldéhyde, thiol, disulfure iodoacétyle, ester, anhydride, tosyle, mésyle, trityle, silyle ou analogues.

La formation d'un conjugué résultant du couplage covalent d'un anti-ligand, par exemple un polynucléotide à un polypyrrole fonctionnalisé selon l'invention peut  
30 être effectuée selon les méthodes dites directes ou indirectes connues.

Par exemple, dans le cas d'un polynucléotide, selon la méthode directe, on synthétise un polynucléotide ayant une fonction réactive sur un site quelconque de la chaîne nucléotidique comme par exemple, l'extrémité 5' ou l'extrémité 3', ou sur une base ou sur un phosphate internucléotidique, ou sur la position 2' d'un sucre. Le  
35 polynucléotide est ensuite couplé au polymère, préparé au préalable et comportant une fonction réactive complémentaire de la précédente, c'est-à-dire permettant la



formation d'une liaison covalente par réaction entre les deux fonctions réactives complémentaires, l'une portée par le polynucléotide et l'autre par le polymère fonctionnalisé. Par exemple, de façon connue, on peut coupler des amines primaires avec un acide carboxylique activé ou un aldéhyde ou bien une fonction thiol avec un halogénoalkyle. De préférence, la fonction réactive du polynucléotide pour le couplage sur le polymère est à l'extrémité 5' ou 3'.

Dans la méthode de couplage indirecte, le polynucléotide et le polymère sont chacun porteurs d'une fonction réactive, ces fonctions réactives pouvant être identiques ou différentes l'une de l'autre, ces deux fonctions n'étant pas complémentaires mais étant capables de réagir avec un agent intermédiaire de couplage qui est un réactif bifonctionnel (homobifonctionnel si les deux fonctions sont identiques ou hétérobifonctionnel si les deux fonctions sont différentes). Parmi les agents de couplage homobifonctionnels, on peut citer le DITC (phénylène-1,4-diisothiocyanate), le DSS (disuccinimidylsubérate) ou analogues. Parmi les agents de couplage hétérobifonctionnels, on peut citer le SMCC (succinimidyl-4-(N-maléimidométhyl) cyclohexane-1-carboxylate), ou le SMPB (succinimidyl-4-(p-maléimido phényl) butyrate), capables de réagir d'une part avec une amine primaire et d'autre part avec un thiol.

L'invention sera mieux comprise à la lecture de la description détaillée qui va suivre faite en référence aux figures annexées dans lesquelles,

la figure 1 représente des exemples de polymères conjugués tels que 1) polyacétylène; 2) polypyrrole ; 3) polythiophène ; 4) polyphénylène ; 5) polyaniline ;

la figure 2A représente un polypyrrole substitué en position 3 avec l'acide acétique (1) et et les figures 2B, 2C, 2D, 2E et 2F représentent des polypyrroles substitués en position 3 avec différents peptides (2 à 6, respectivement) ;

la figure 3 représente les voltamogrammes de quatre polymères fonctionnalisés, ci-dessous identifiés en milieu H<sub>2</sub>O-NaCl 0,5 M

le poly(pyrrole-acétique acide) en (1), le poly(pyrrole(Gly-DPhe)) en (2), le poly(pyrrole(Val)) en (3) et le poly(pyrrole(Phe)) en (4) ;

la figure 4, représente le voltamogramme de Poly(2), en milieu H<sub>2</sub>O-NaCl 0,5 M, en présence de carboxypeptidase A en concentration respectivement de 0,0 mg dans 5cm<sup>3</sup> d'électrolyte (a), 1,2 mg dans 5cm<sup>3</sup> d'électrolyte (b), 2,4 mg dans 5cm<sup>3</sup> d'électrolyte (c), et 5,0 mg dans 5cm<sup>3</sup> d'électrolyte (d) ;

la figure 5, correspond à la réponse ampérométrique d'une électrode, Poly(2), en fonction de la quantité d' enzyme, carboxypeptidase A, en nanomoles, existant dans

- le milieu. La relation linéaire entre courant observé et quantité d'enzyme, à un potentiel de 0,3 V est donnée par rapport à une électrode calomel saturé, la figure 6, est un schéma de principe d'un transistor microélectrochimique à effet de champ pour la détection (amplifiée) de la présence d'une espèce biologique reconnue
- 5 par un polymère conducteur fonctionnalisé. Les abréviations suivantes signifient respectivement: P : polymère. Sub, substrat. S, D, électrodes de source et de drain respectivement CE, contre-électrode jouant le rôle de grille G. R, électrode de référence. Poten., potentiostat,
- la figure 7, est un schéma de principe d'une cellule électrochimique à membrane
- 10 polypyrrole fonctionnalisée et à deux compartiments, pour l'extraction d'espèces biologiques reconnues par un substituant greffé sur une chaîne de polymère conjugué électroactif, la figure 8, représente le voltamogramme du poly[N-hydroxysuccinimide-3-pyrrole], en milieu acétonitrile-0,1 M LiClO<sub>4</sub> avec une électrode de référence au calomel saturé, montrant une électroactivité et une réversibilité électrochimique élevées,
- 15 la figure 9, représente le voltamogramme d'une électrode de copolymère Poly([pyrrole-ODN][pyrrole-COOH]), avec comme polynucléotide ou oligonucléotide ODN de séquence CCTAAGAGGGAGTG. Aucune modification n'est observée après incubation de ce polymère avec une séquence non cible, GGTGATAGAAGTATC, et
- 20 la figure 10, représente le voltamogramme d'une électrode de copolymère Poly([pyrrole-ODN][pyrrole-COOH]), avec comme oligonucléotide ODN: CCTAAGAGGGAGTG. Cette électrode a été incubée en présence d'une cible, CACTCCCTCTTAGG, 335 nmole, à 37°C pendant 2h. Cette électrode a ensuite été rincée et analysée en milieu électrochimique. Un déplacement de potentiel est observé
- 25 par rapport au voltamogramme précédent.

Les polymères selon l'invention sont notamment utilisables pour la détection d'espèces biologiquement actives susceptibles d'être présentes dans un échantillon et de réagir avec l'anti-ligand ou les anti-ligands greffés. En effet, comme montré ci-après on observe que les polymères conjugués fonctionnalisés en position 3 de leur

30 hétérocycle et auxquels sont greffés un ou plusieurs anti-ligands, après réaction avec un ou plusieurs ligands, présentent une modification de la réponse électrochimique par rapport à un polymère de référence n'ayant pas réagi avec le ou les ligands d'un milieu biologique, visualisée par un changement du potentiel d'oxydation. Cette variation du voltamogramme électrochimique d'oxydoréduction du polymère confère

35 une fonction de capteur, et peut ainsi être utilisée pour une mesure quantitative de l'espèce biologiquement active, soit par la variation du potentiel, à courant fixe, soit

par la variation du courant, à potentiel fixe, ou encore par la réalisation de transistors microélectrochimiques à effet de champ.

Par ailleurs, les polymères de l'invention sont également utilisables pour l'extraction d'espèces biologiquement actives en solution. Dans plusieurs cas, l'espèce biologiquement active en solution se combine de façon forte à l'anti-ligand greffé sur la chaîne de polymère, tel qu'un peptide bioactif ou un polynucléotide, ce qui permet donc d'extraire l'espèce biologiquement active de façon sélective d'un milieu. Ce type d'extraction peut être réalisé *in vitro*, ou même *in vivo* lorsque le polymère support est biocompatible, tel que le polypyrrole par exemple.

Enfin, les polymères de l'invention peuvent être une source de relargage, d'un milieu dans un autre milieu, d'espèces biologiquement actives (enzymes ou autres).

La fonctionnalisation des polymères conducteurs électroactifs de l'invention, tels que polypyrroles, par des groupes montrant une reconnaissance vis à vis de composés d'intérêt biologique peut être étendue à la reconnaissance d'acides nucléiques (AN). Ainsi le greffage de polynucléotides ou oligonucléotides, ODN, le long de la chaîne conjuguée de polymères doit permettre la discrimination au sein d'un milieu biologique des AN ou fragments d'AN correspondants. Cette reconnaissance sera opérée par hybridation sélective entre l'ODN, greffé sur le polymère, et l'AN correspondant existant dans le milieu externe, dans lequel est immergé le film de polymère fonctionnalisé, à l'image de la reconnaissance "peptide/enzyme" décrite ultérieurement. La complexation "ODN/AN" résulte en une modification des propriétés physicochimiques du polymère conjugué, dont la caractérisation permettra de confirmer la présence de l'AN recherché.

Le point essentiel concerne la nature des propriétés physicochimiques du polymère appelées à être modifiées lors de la reconnaissance "ODN/AN". En effet, afin de développer une méthode de mesure rapide, sensible et quantitative de la présence d'AN, le but de la présente invention concerne l'élaboration de matériaux électroactifs, dont la réponse électrochimique sera modifiée après hybridation "ODN/AN". La modification concernera une variation de type potentiométrique, comme variation du potentiel d'oxydation du polymère, ou ampérométrique, par variation du courant d'oxydation (ou de réduction) observé à un potentiel déterminé. Ces variations de réponse électrochimique pourront être mesurées quantitativement, les films de polymères fonctionnalisés étant utilisés soit comme capteurs électrochimiques de type ampérométrique ou potentiométrique, soit encore dans une structure de transistor microélectrochimique à effet de champ, ainsi que cela a été décrit précédemment dans le cas de la reconnaissance enzymatique à partir de

peptides greffés sur polypyrrole. L'intérêt de ce type de mesures concerne la rapidité, la sensibilité, et la possibilité de réaliser aisément des cartes matricielles de  $2n$  éléments de mesure, comportant  $n$  ODN cibles et non cibles, capables donc de discriminer rapidement la présence ou l'absence de gènes dans un milieu.

- 5 De même que dans le cas de la reconnaissance enzymatique précédemment décrite, un second point essentiel concerne le fait que pour obtenir une réponse électrochimique à un phénomène de reconnaissance, la fonctionnalisation en position 3 d'un noyau hétérocyclique (pyrrole) est indispensable.

Afin d'assurer une réponse de type électrochimique précise pour ces  
10 polymères, il est nécessaire que la fonctionnalisation des chaînes conjuguées soit compatible avec une électroactivité importante du polymère fonctionnalisé. La nécessité d'une telle électroactivité exige, dans le cas de polyhétérocycles hydrophiles tels que le polypyrrole, que la fonctionnalisation soit opérée en position 3 du cycle pyrrolique. Les polymères de l'invention sont des polymères électroactifs dans  
15 lesquels soit toutes les unités monomères sont fonctionnalisées avec un antiligand tel qu'un oligonucléotide, soit une partie seulement des unités monomères sont ainsi fonctionnalisées. Il est bien entendu que les unités monomères peuvent être fonctionnalisées par des antiligands identiques ou différents, dans ce dernier cas les polymères de l'invention peuvent être utilisés pour la détection de plusieurs ligands  
20 cibles dans un même échantillon. Les polymères de l'invention peuvent être réalisés par les différentes voies suivantes:

a) Polymères totalement fonctionnalisés.

Dans cette voie, la première étape concernera la fonctionnalisation du monomère, tel que pyrrole, par un antiligand tel qu'un oligonucléotide déterminé. La seconde étape  
25 concernera ensuite la polymérisation de ce monomère, aboutissant à un film de polymère dans lequel toutes les unités monomères sont fonctionnalisées.

b) Copolymères partiellement fonctionnalisés.

Dans le cas particulier des acides nucléiques cibles, et compte tenu du fait de leur taille généralement importante, la fonctionnalisation de toutes les unités monomères,  
30 de petites tailles, du polymère n'est pas nécessaire, et l'une des voies concernera donc la réalisation, d'un copolymère, qui fera intervenir d'une part les unités monomères fonctionnalisées décrites en a), et également des unités pyrrole non fonctionnalisées avec l'oligonucléotide antiligand.

c) Fonctionnalisation d'un polymère précurseur

35 La fonctionnalisation partielle d'un film de polymère peut également être réalisée à partir d'un film de polymère conjugué, dans lequel sont introduits au préalable des

groupes chimiques compatibles avec le greffage d'un antiligand tel qu'un oligonucléotide. Dans cette voie, un monomère comportant un synthon de greffage sera d'abord réalisé, tel que le [N-hydroxysuccinimide-3-pyrrole]. Le synthon [N-hydroxysuccinimide] est connu pour permettre le greffage ultérieur d'un oligonucléotide. Ce monomère sera par la suite polymérisé, ou encore copolymérisé avec un autre dérivé de pyrrole. Le film de polymère obtenu sera ensuite immergé dans un milieu réactionnel contenant un oligonucléotide, et la réaction de greffage de cet oligonucléotide sur les monomères pyrrole sera entreprise. Ce greffage n'interviendra en fait que sur une partie des unités monomères pyrrole constitutives du polymère.

#### Exemple.1: Synthèse des monomères

Dans l'exemple décrit dans ce qui suit, le polypyrrole (1) a été choisi comme support polymère conjugué compte tenu de sa biocompatibilité (H. Naarmann, communication personnelle). Un bras espaceur acétyle A, est greffé entre l'atome de carbone 3 du noyau pyrrole et le substituant peptidique pour préserver la conductivité et l'électroactivité du polypyrrole fonctionnalisé correspondant. Différents peptides, avec leur fonction terminale carboxylique non protégée ou protégée sous la forme ester méthylique, ont été choisis pour leur pertinence biologique et greffés sur un monomère pyrrole-acétique acide, PyA (1). Plusieurs mono et dipeptides ont été greffés, et ont conduit aux dérivés pyrroliques suivants, représentés sur la figure 2 : pyrrole-acétique acide, PyA (1), pyrrole(Glycine-dPhénylalanine), Py(Gly-DPhe) (2), pour sa capacité de complexation avec les enzymes protéolytiques tels que carboxypeptidase A (Sigma) et trypsine (Sigma) (J.R. Uren, Biochim. Acta, 1971, 236, 67), pyrrole(valine), Py(Val) (3), pyrrole(phénylalanine), Py(Phe) (4), pyrrole(Phénylalanine-Proline), Py(Phe-Pro).(5). Des dérivés de dipeptide plus volumineux peuvent également être greffés, tel que le Phénylalanine-Hydroxyethylamine-Proline, Py(Phe[HEA]Pro) (6), connu pour être un inhibiteur potentiel intéressant pour la protéase associée au virus HIV-1 du SIDA. Ces monomères ont été synthétisés suivant une voie chimique décrite (D. Delabouglise, F. Garnier, Synth. Met., 1990, 39, 117). Ces monomères ont été purifiés et caractérisés par RMN, microanalyse, et spectrométrie de masse.

### Exemple 2: Polymérisation

Ces monomères ont été polymérisés par voie électrochimique sur électrode de platine de 0,7 cm<sup>2</sup>, ainsi que sur grille de platine de 10 cm<sup>2</sup> de surface, en milieu carbonate de propylène avec 0,5 M de NaCl, à un potentiel constant de 0,8 V/SCE. Des films  
5 épais de polymère sont obtenus, jusqu'à des épaisseurs de 10 µm. Comme le montre la figure 3, l'électroactivité de ces polymères a été confirmée par voltamétrie cyclique en milieu H<sub>2</sub>O-NaCl 0,5 M, à un pH neutre de 7. Les valeurs de potentiel d'oxydation, de l'ordre de 0,30 V/SCE, proches de celle du polypyrrole non substitué, confirment l'électroactivité de ces polypyrroles fonctionnalisés avec des  
10 dipeptides.

### Exemple 3: Reconnaissance de carboxypeptidase A

Les propriétés spécifiques de complexation de ces polypyrroles vis à vis d'enzymes protéolytiques ont été analysées avec la carboxypeptidase A, avec laquelle (Gly-DPhe)  
15 est connu pour former des complexes stables à pH neutre. Des solutions de concentration croissante de carboxypeptidase A, allant de 1mg à 5 mg dans 5 cm<sup>3</sup> de H<sub>2</sub>O-NaCl 0,5 M ont été analysées. Lorsque l'on immerge dans cette solution des électrodes non spécifiques telles que polypyrrole non substitué, ou poly(3, 4, 5 ou 6), un voltamogramme identique à celui obtenu à l'exemple 2 est observé, sans  
20 modification aucune. Lorsque cependant l'on utilise le poly(pyrrole(Gly-DPhe)), poly(2), le voltamogramme montre un déplacement vers les potentiels plus élevés, de 0,340 V/SCE pour une quantité initiale nulle en carboxypeptidase A jusqu'à une valeur limite de 0,500 mV/SCE pour une quantité de 5mg de carboxypeptidase A dans la solution. Ce résultat est reporté dans la figure 4, qui montre le déplacement  
25 de potentiel, attribué à un encombrement et une rigidification de la chaîne de polypyrrole, produite lors de la complexation de l'enzyme sur le dipeptide porté par la chaîne polymère. La formation de ce complexe entre enzyme et poly(pyrrole-dipeptide) a été confirmée par le relargage de l'enzyme en milieu acide, à pH = 3, ainsi que cela est réalisé classiquement en chromatographie d'affinité (I.M. Chaiken,  
30 M. Wilchek, I. Parikh, Affinity Chromatography and Biological Recognition, Academic Press, New York, 1983). L'enzyme relarguée a été caractérisée de façon classique par le test de Bradford, en mesurant l'activité enzymatique avec le bleu brillant de Comassii, et par l'utilisation d'un standard d'albumine de serum de bovin. Lorsque l'on utilise un film de poly(Gly-DPhe) contenant 5x10<sup>-6</sup> unités monomères,  
35 correspondant à une charge de polymérisation de 1 Coulomb, une quantité significative de 400 microgrammes de carboxypeptidase A a été obtenue après

relargage dans un milieu acide. Considérant la taille de cette enzyme, de 307 unités d'aminoacides, cette quantité d'enzyme relarguée montre qu'environ 1 molécule d'enzyme est complexée pour 200 unités monomères de (pyrrole-dipeptide), ce qui semble raisonnable compte tenu de la différence de taille (environ d'un facteur 100).

5 Ce résultat montre également que l'enzyme doit être distribuée à l'intérieur du film de polymère, ce qui démontre sa perméabilité vis à vis de l'enzyme. Des résultats comparables ont été obtenus lorsque la trypsine a été utilisée comme enzyme.

A un potentiel déterminé de l'électrode, comme le montre la figure 4, une variation de courant est observée en fonction de la concentration d'enzyme. Ce résultat  
10 correspond à la réponse ampérométrique de l'électrode, et une des caractéristiques intéressantes de cette réponse concerne sa linéarité avec la concentration d'enzyme, tel que le montre la figure 5. Une telle relation linéaire permet de proposer un dosage quantitatif de l'espèce biologique en solution, soit par l'utilisation d'un capteur de type électrochimique, soit par le développement d'un transistor à effet de champ,  
15 représenté schématiquement en figure 6. Le principe de fonctionnement en est le suivant. Le polymère est réalisé sur les électrodes de source et de drain, déposées sur un substrat. Cet ensemble est immergé dans la solution à analyser, et une contre-électrode dans ce même milieu représente la grille de ce transistor. Lorsque cette électrode de grille est placée à un potentiel où la variation du voltamogramme en  
20 fonction de la concentration d'enzyme est maximale, vers 0,2 V dans le cas représenté à la figure 4, la conductivité du polymère varie de façon importante avec la concentration d'enzyme. Un potentiel appliqué alors entre électrodes de source et de drain permet d'obtenir un signal amplifié, ce transistor fonctionnant suivant le principe d'un transistor à effet de champ.

25

#### Exemple 4: Relargage contrôlé d'une enzyme

Une caractéristique supplémentaire intéressante de ces électrodes concerne le fait qu'il a été montré dans la littérature que le poly(pyrrole acétique acide), ou poly(1)  
30 relargue des protons dans le milieu électrolytique lorsqu'il est soumis à oxydation électrochimique (P. Bäuerle et al. Adv. Mater., 1990, 2, 490). Des variations importantes de pH peuvent être observées dans un faible volume électrolytique, jusqu'à des valeurs de l'ordre de 3. Ce relargage de protons s'observe également lorsque la fonction carboxylique est éloignée du noyau pyrrole, tel que c'est le cas pour un aminoacide ou un peptide non protégé greffé sur le pyrrole. Deux voies  
35 existent pour le relargage contrôlé de protons, soit l'utilisation d'un peptide dont la fonction terminale carboxylique n'est pas protégée, COOH, soit par l'utilisation d'un

copolymère entre pyrrole-acétique acide et pyrrole-peptide protégé. Un exemple de cette deuxième voie est donné. Un copolymère entre Py(A), (1) et Py(Gly-DPhe), (2), a été réalisé électrochimiquement, dans les mêmes conditions que précédemment. Ce copolymère, Poly(1, 2) conduit, lorsque soumis à électrooxydation à 0,3 V/SCE à une variation de pH importante jusqu'à pH = 4 au voisinage de l'électrode.

A partir de ce copolymère Poly(1, 2), ou à partir du polymère Poly(2) dont la fonction carboxylique est libre, deux procédés peuvent être mis en oeuvre pour l'extraction, un procédé en discontinu et un procédé en continu.

a) Procédé discontinu.

- 10 Ce procédé consiste à utiliser une membrane ou électrode à base des matériaux précités, de la mettre en contact avec le milieu dans lequel l'espèce biologiquement active recherchée, coexiste avec d'autres espèces. L'affinité sélective apportée par le peptide greffé vis à vis de cette espèce recherchée provoquera la complexation de cette dernière sur le peptide greffé sur le polymère de l'électrode ou de la membrane.
- 15 Cette membrane ou électrode est ensuite retirée du milieu d'analyse et introduite dans un autre milieu, dit de récupération. Dans ce milieu de récupération, contenant un sel support de type NaCl, l'électrode ou membrane est soumise à une oxydation électrochimique, qui provoque l'expulsion de protons, par les groupes acides carboxyliques, jusqu'à un pH suffisant pour la dissociation et le relargage de l'espèce
- 20 recherchée.

b). Procédé en continu.

- Le copolymère Poly(1, 2), ou le polymère Poly(2) avec sa fonction carboxylique libre, est réalisé sous forme de membrane ou d'électrode, avec éventuellement l'aide d'un polymère support, polycationique ou polyanionique, de type polystyrene sulfonate ou encore membrane perfluorée telle que Nafion. Cette électrode ou
- 25 membrane, éventuellement composite, constitue la jonction entre deux compartiments A et B, tel que schématisé dans la figure 7. Un exemple d'extraction de carboxypeptidase A par ce dernier procédé en continu est décrit dans ce qui suit.

- L'élément biosélectif est constitué, dans le cas exposé de la figure 7, d'un copolymère Poly(1, 2) décrit précédemment, polymérisé dans une membrane de NAFION (Aldrich), obtenue par évaporation sur une grille très fine de platine de 10  $\mu$ l d'une solution à 5 % de NAFION dans un mélange d'alcools linéaires supérieurs (Aldrich). Le film de NAFION qui en résulte, qui présente une épaisseur d'environ 5  $\mu$ m, sert alors de support pour l'électropolymérisation du copolymère Poly(1, 2),
- 35 aboutissant à une membrane composite électroactive Poly(1, 2)-NAFION.



Dans une première étape 1, une quantité de 10 grammes de carboxypeptidase A est introduite dans le compartiment A, dans un milieu  $H_2O-NaCl$  0,5 M. Une complexation sur la membrane de composite [Poly(1-2)]-NAFION, s'ensuit immédiatement sur les unités peptidiques de (2), telle que décrite précédemment à l'exemple. 3. Par la suite, une oxydation est réalisée, au moyen d'une contre électrode et électrode de référence introduites dans le compartiment B. Dans une seconde étape 2, l'oxydation électrochimique conduit au relargage de protons dans ce compartiment B, jusqu'à un pH de l'ordre de 4, et au relargage immédiat de la carboxypeptidase A. Une quantité de 1,2 grammes de carboxypeptidase A a été alors récupérée dans le compartiment B lors d'un cycle de ce processus en continu, ainsi que cela a été déterminé par dosage de l'activité enzymatique.

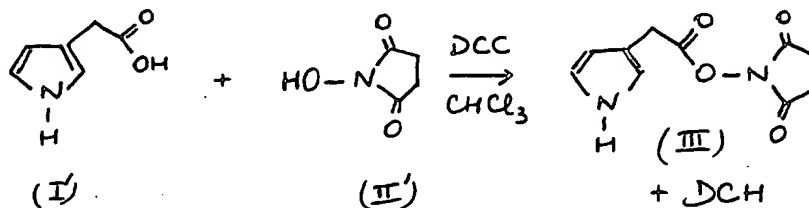
Ces résultats confirment ainsi le phénomène de reconnaissance de ces électrodes vis à vis d'enzymes, ainsi que leur capacité d'extraction de ces enzymes. Ce comportement est lié de façon biunivoque à la nature chimique du dipeptide greffé sur la chaîne de polypyrrole.

Exemple 5: synthèse d'un polypyrrole fonctionnalisé avec un polynucléotide ou oligonucléotide

Cette synthèse est effectuée suivant les 3 étapes suivantes.

a) Synthèse du monomère [N-hydroxysuccinimide 3-pyrrole]

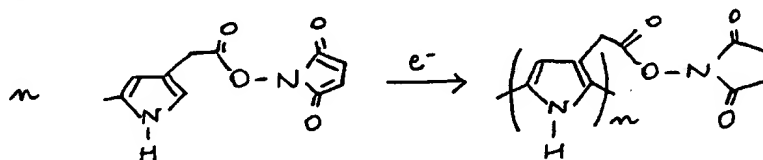
Dans un tricol sont additionnés 0,4 mole de pyrrole-acide acétique, (I), 30 ml de chloroforme et 0,4 mole de N-hydroxysuccinimide, NHS; (II'). Le mélange est soumis à agitation, puis on additionne goutte à goutte une solution de 0,4 mole de dicyclohexylcarbodiimide, DCC, dans 20 ml de chloroforme. Après agitation pendant 2 heures, un solide blanc est formé qui est filtré et lavé au chloroforme. Après évaporation et lavage à l'acétonitrile pour se débarrasser de produits de réaction non nécessaires, on recristallise le produit dans le chloroforme. On obtient alors le composé recherche, [N-hydroxysuccinimide-3-pyrrole], (III), sous forme d'une poudre blanche.



Point de fusion,  $T_F = 135^\circ \text{C}$ .  $^1\text{HMRN}$  (ppm): (NH, 1H, 9, s); pyrrole (2H, 6,7, m); pyrrole (1H, 6,1, s);  $\text{CH}_2$  (2H, 3,8, s); Hydroxysuccinimide (4H, 2,8, s).

b) Synthèse du polymère par électropolymérisation

- 5 La solution d'électropolymérisation contient 0,5 M  $\text{LiClO}_4$ , 0,1 M de monomère (III) dans l'acétonitrile. L'électropolymérisation est réalisée sur électrode de platine de  $0,7 \text{ cm}^2$  de surface, au potentiel de 0,9 V par rapport à une électrode saturée au calomel, ECS, en utilisant une charge d'électropolymérisation de 30 mC. Un film noir apparaît sur l'électrode, correspondant à poly(III), dont l'épaisseur est
- 10 d'environ 200 nm.



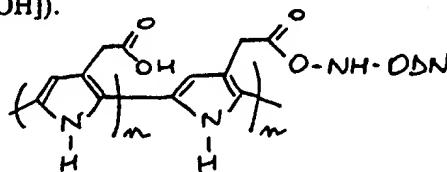
15

- L'électroactivité de ce polymère a été analysée dans un milieu acétonitrile-0,5 M  $\text{LiClO}_4$ , montrant un pic d'oxydation à 0,28 V/ECS, et un pic de réduction à 0,24 V/ECS, tel que le montre la figure 8. Le faible écart entre ces pics d'oxydation et de
- 20 réduction, 40 mV, confirme la très grande électroactivité et réversibilité de ce polymère.

c) Greffage d'un oligonucléotide ODN

- L'électrode précédente portant le film de polymère est immergée dans un milieu réactionnel formé d'un mélange de diméthylformamide avec 10 % de tampon borate
- 25 0,1 M, à pH de 9,3, et 26,2 nanomoles de l'oligonucléotide, ODN, de 14 bases comportant la séquence CCTAAGAGGGAGTG ainsi qu'une fonction amine en 5' sur laquelle sera opérée la réaction de couplage avec le groupe N-hydroxysuccinimide porté par les unités pyrrole du polymère. Cette réaction de couplage s'effectue en 2
- 30 heures. Le greffage s'accompagne également de l'hydrolyse des groupements succinimide, non substitués avec l'oligonucléotide, en acide acétique. Le polymère obtenu sur l'électrode correspond donc à un copolymère Poly([pyrrole-ODN][pyrrole-COOH]).

35



Exemple 6.: Caractérisation du phénomène de reconnaissance.

- 5 Le phénomène de reconnaissance a été confirmé par la caractérisation électrochimique du film de polymère Poly([Pyrrole-ODN][pyrrole-COOH]), obtenu à l'exemple 5c. L'analyse électrochimique a été menée, d'abord directement sur l'électrode obtenue après synthèse, puis après que cette électrode ait été mise en présence d'ODN cible et d'ODN non cible. La réaction d'hybridation de ce polymère
- 10 a ainsi été réalisée en présence d'ODN complémentaire (cible) et d'ODN non complémentaire (non cible), dans une solution aqueuse tamponnée avec du PEG. L'incubation est effectuée à 37 °C pendant 2 heures, en présence soit d'ODN cible CACTCCCTCTTAGG, en concentration de 335 nanomoles, soit en présence d'ODN non cible, GGTGATAGAAGTATC, en concentration de 272 nanomoles. Après
- 15 réaction, les films ont été rincés avec le tampon PEG et analysés par voltamétrie cyclique. Les voltamogrammes obtenus sont représentés sur les figures 9 et 10. Les résultats montrent en premier lieu, Figure 9, que le polymère après synthèse, et avant d'être mis en présence de la séquence cible ou non cible, montre un pic d'oxydation réversible qui se situe à 0,34 V/ECS, confirmant l'électroactivité de ce polymère
- 20 fonctionnalisé. Après réaction d'incubation en présence de la séquence non cible, et après rinçage, le voltamogramme obtenu ne montre aucune modification. Lorsque par contre ce polymère est incubé en présence de la cible, le voltamogramme obtenu, Figure 10, est différent, avec un accroissement du potentiel d'oxydation à 0,40 V/ECS, soit une augmentation de 60 mV. Cet accroissement est tout à fait significatif
- 25 d'une hybridation qui a eu lieu entre l'ODN et la cible correspondante. Cette augmentation du potentiel d'oxydation est attribuée à un phénomène de complexation du bras pendant le long des chaînes de polypyrrole, s'accompagnant donc d'un accroissement de l'énergie nécessaire à l'oxydation de ce polymère.

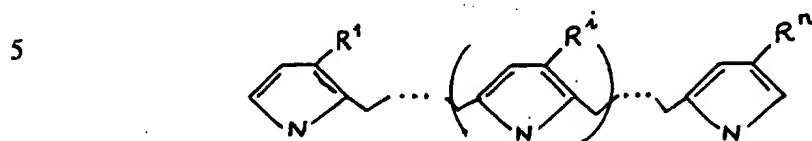
Ce résultat confirme que cette nouvelle classe de matériaux électroactifs, de

30 polyhétérocycles conjugués substitués en position 3 par un oligonucléotide, donne effectivement lieu à un phénomène de reconnaissance d'ADN complémentaire, et d'autre part que ces matériaux permettent une lecture électrochimique de cette hybridation sélective. Cette lecture électrochimique ouvre la voie à des génocapteurs de type électrochimique, ampérométrique ou potentiométrique, et d'autre part à des

35 génocapteurs de type transistor microélectrochimique à effet de champ, basés sur une réponse ampérométrique.

**REVENDICATIONS**

1 - Polymère conjugué fonctionnalisé, électriquement conducteur et électroactif caractérisé en ce qu'il répond à la formule I :



dans laquelle

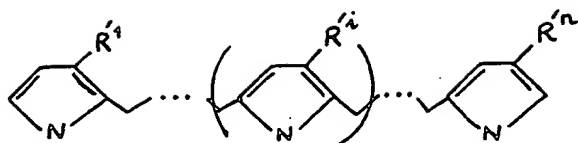
- 10 \* n est un nombre entier non nul et i est un nombre entier variant de 2 à n-1, et  
 \*  $R^1$ ,  $R^i$ ,  $R^n$ , identiques ou différents, représentent chacun H ou un groupe fonctionnel susceptible de se lier, par covalence, à une première molécule biologique ou anti-ligand, et en ce que ledit polymère présente une conductivité et une électroactivité sensiblement du même ordre que celle du polymère conjugué non  
 15 fonctionnalisé correspondant, c'est-à-dire du polymère de formule I correspondant, dans laquelle  $R^1$ ,  $R^i$ ,  $R^n$  représentent chacun H.

- 2 - Polymère selon la revendication 1, caractérisé en ce que le ou les groupements fonctionnels sont indépendamment choisis dans l'ensemble de groupes fonctionnels  
 20 suivants :  
 $Y_p-C-X$  où X représente H, OH, un radical O-alkyle inférieur substitué ou non, un halogène, notamment Cl;  $Y_p-NHZ$ , Z représentant H ou un radical alkyle;  $Y_p-NH-CO-CF_3$ ;  $Y_p-X$  où X répond à la définition ci-dessus, p étant un nombre entier de préférence égal à 0, 1 ou 2 ;  $-Si(alkyle)_3$ ,  $-Si(alkoxyle)_3$ , ou un groupement ester  
 25 activé tel que le N-hydroxy-succinimide.

- 3 - Polymère selon la revendication 2, caractérisé en ce que Y représente un groupement choisi parmi les alkyles ayant de 1 à 5 atomes de carbone, les alkoxyes ayant de 1 à 5 atomes de carbone, les polyéthers répondant à la formule générale  
 30  $(CH_2-CH_2-O)_m-(CH_2)_{m'}$ , m représentant un nombre entier variant de 1 à 3 et m' un nombre entier égal à 1 ou 2.

- 4 - Polymère conjugué, électriquement conducteur, et électroactif comprenant au moins un groupe fonctionnel lié, par covalence, à une première molécule biologique  
 35 ou anti-ligand, caractérisé en ce que ledit polymère répond à la formule II

19



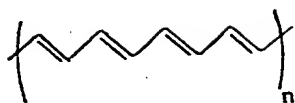
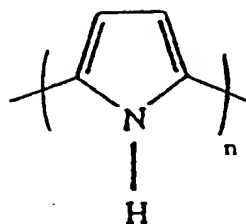
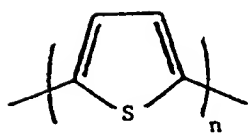
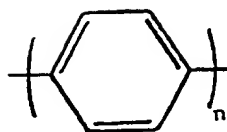
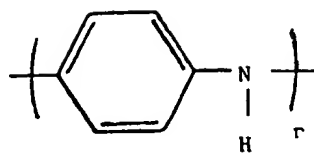
- 5 dans laquelle :
- \* n est un nombre entier non nul et i est un nombre entier variant de 2 à n-1, et
  - \*  $R'^1$ ,  $R'^i$ ,  $R'^n$ , identiques ou différents, représentent chacun H ou un groupe fonctionnel susceptible de se lier, ou lié, par covalence, à une première molécule biologique ou anti-ligand.
- 10
- 5 - Polymère selon la revendication 4, caractérisé en ce que les groupes fonctionnels liés à une molécule biologique ou ligand sont choisis, avant réaction avec cette dernière, dans l'ensemble des groupes fonctionnels suivant :
- 15  $Y_p-C-X$  où X représente H, OH, un radical O-alkyle inférieur substitué ou non, un halogène, notamment Cl;  $Y_p-NHZ$ , Z représentant H ou un radical alkyle;  $Y_p-NH-CO-CF_3$ ;  $Y_p-X$  où X répond à la définition ci-dessus, p étant un nombre entier de préférence égal à 0, 1 ou 2 ;  $-Si(alkyle)_3$ ,  $-Si(alkoxyle)_3$ , ou un groupement ester activé tel que le N-hydroxy-succinimide.
- 20 6 - Polymère selon l'une des revendication 4 et 5 , caractérisé en ce que les groupes fonctionnels liés à une molécule biologique sont identiques et consistent, avant réaction avec la première molécule biologique, en  $-(CH_2)-COOH$ .
- 25 7 - Polymère conjugué selon la revendication 6, caractérisé en ce que la ou les premières molécules biologiques ou anti-ligands sont choisis parmi les peptides ou dérivés de peptides notamment Gly-Phe, Phe-Pro, Phe-His-Pro, et parmi les polynucléotides tels que l'oligonucléotide de séquence: CCTAAGAGGGAGTG.
- 30 8 - Utilisation d'un polymère conjugué tel que défini dans l'une des revendications 4 à 7, pour détecter ou doser, in vitro ou in vivo, une seconde molécule biologique ou ligand, différente de l'anti-ligand et interagissant spécifiquement avec ce dernier, la détection et/ou le dosage dudit ligand étant effectué par observation et/ou mesure d'une différence de potentiel ou d'une variation de courant entre le polymère conjugué non lié au ligand et le polymère conjugué lié au ligand.

35

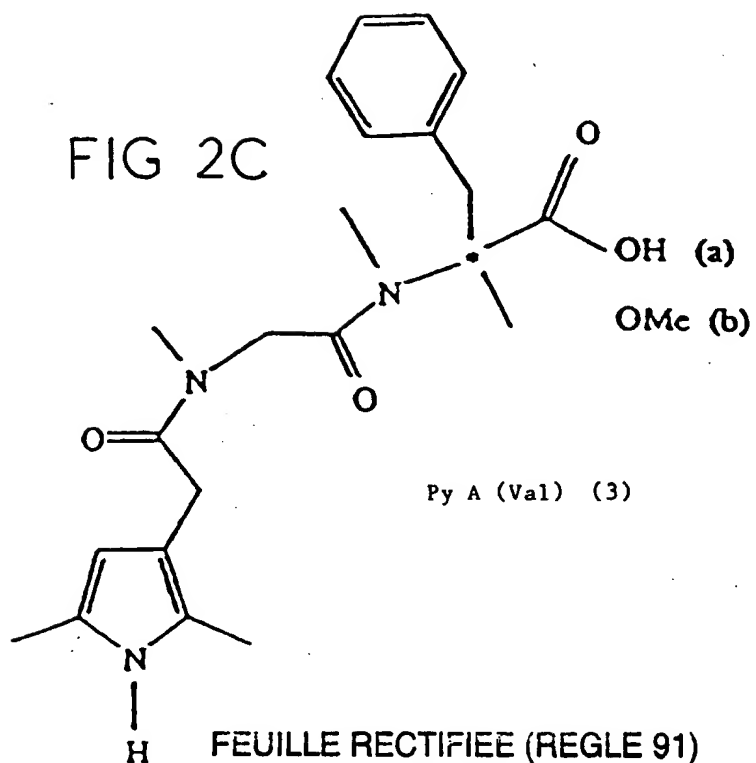
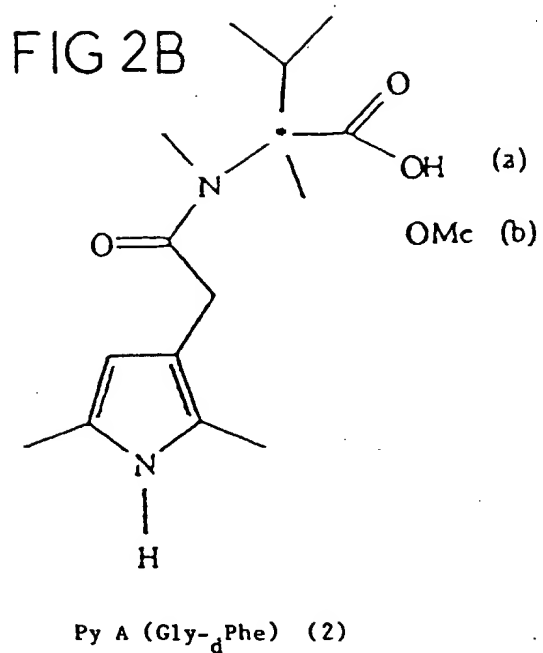
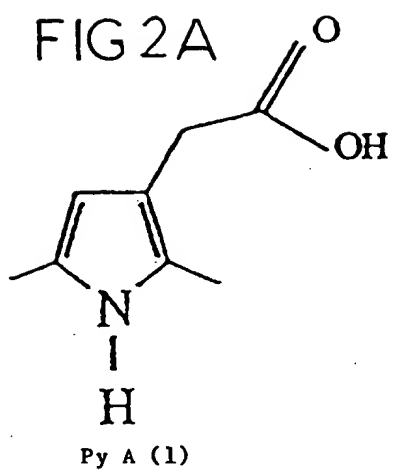
- 9 - Utilisation, selon la revendication 8, d'un polymère défini à la revendication 7, pour détecter et/ou doser une enzyme, telle qu'une enzyme protéolytique notamment la carboxypeptidase A.
- 5 10 - Utilisation selon la revendication 8, d'un polymère défini à l'une des revendications 4 à 7, pour détecter et/ou doser un polynucléotide tel que l'oligonucléotide de séquence CACTCCCTCTTAGG.
- 10 11 - Utilisation d'un polymère conjugué selon l'une quelconque des revendications 4 à 7, pour extraire, in vitro ou in vivo, une seconde molécule biologique ou ligand, différente de l'anti-ligand et interagissant spécifiquement avec ce dernier.
- 15 12 - Utilisation d'un polymère conjugué selon l'une quelconque des revendications 4 à 7, caractérisé en ce que le polymère conjugué est déposé sur un substrat conducteur, tel que le métal ou un dérivé du carbone, ou sous la forme d'un film auto-supporté.
- 20 13 - Electrode caractérisée en ce qu'elle est constituée d'un substrat conducteur tel que un métal ou un dérivé de carbone et d'un polymère tel que défini dans l'une quelconque des revendications 4 à 7.
- 14 - Film auto supporté d'un polymère caractérisée en ce qu'elle est constituée d'un polymère tel que défini dans l'une quelconque des revendications 4 à 7.

1/8

FIG1

12345

2/8

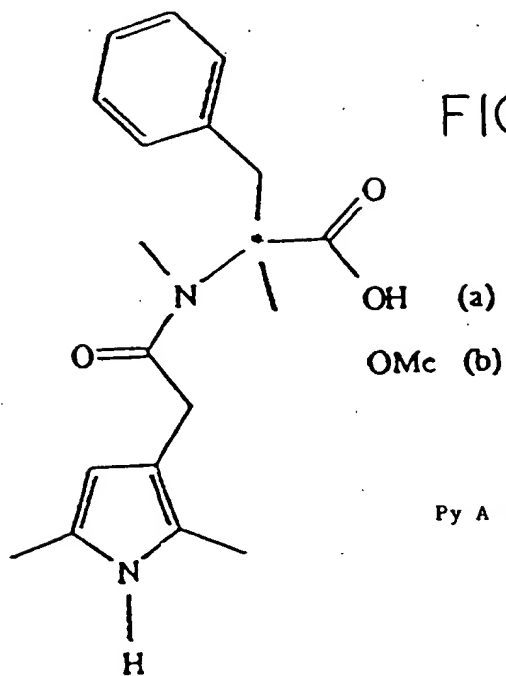


FEUILLE RECTIFIEE (REGLE 91)  
ISA/EP



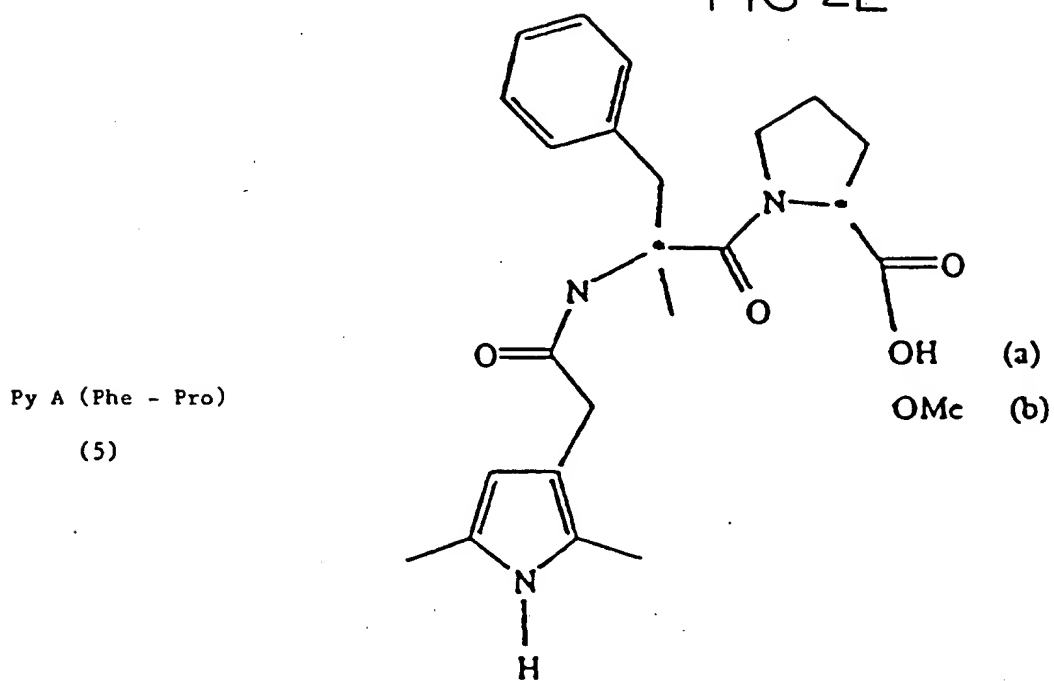
3/8

FIG 2D



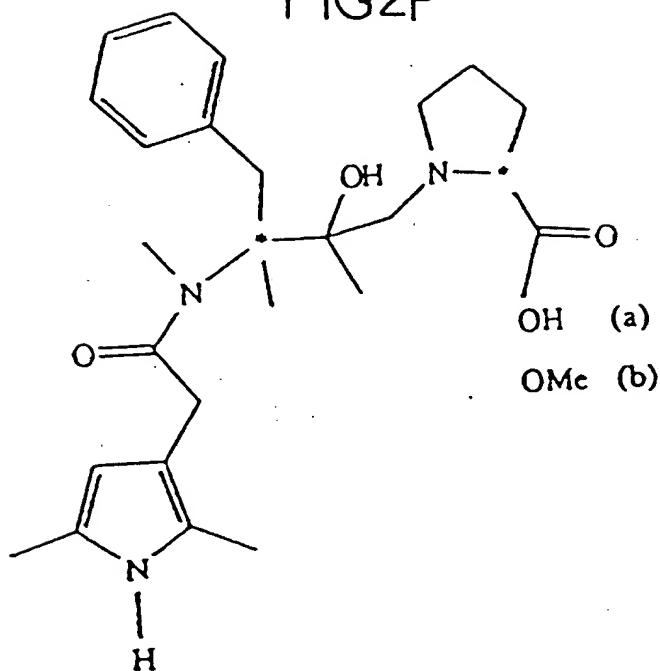
Py A (Phe) (4)

FIG 2E

Py A (Phe - Pro)  
(5)

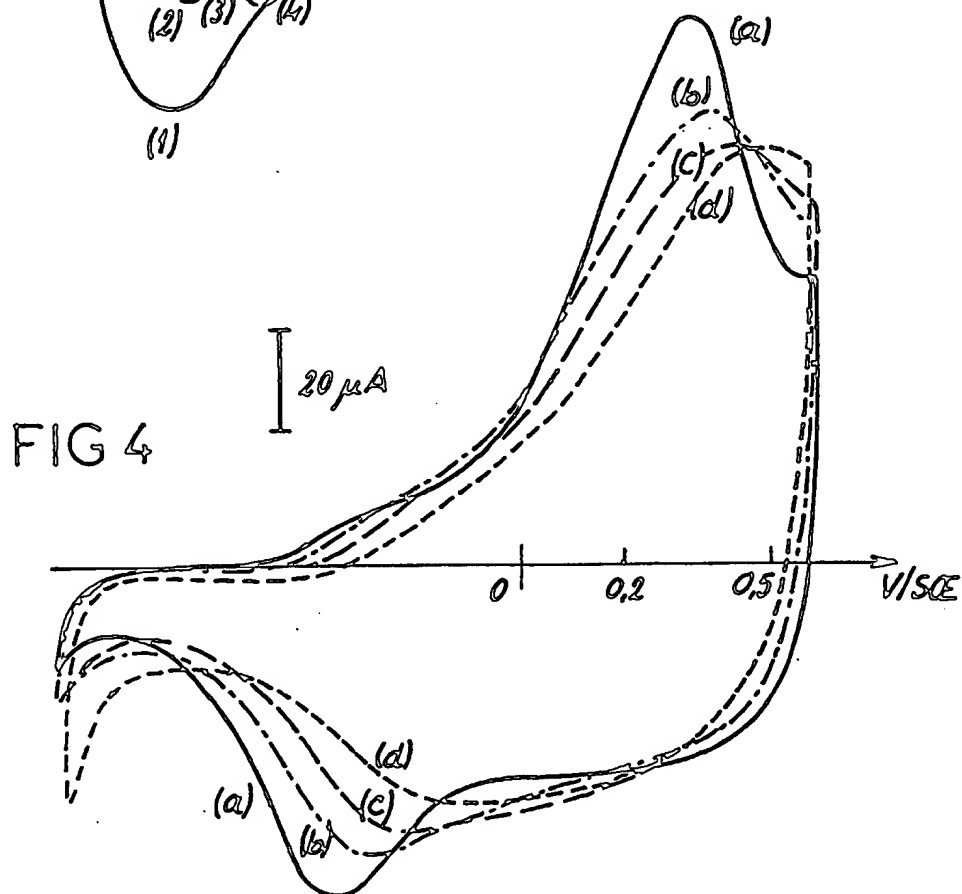
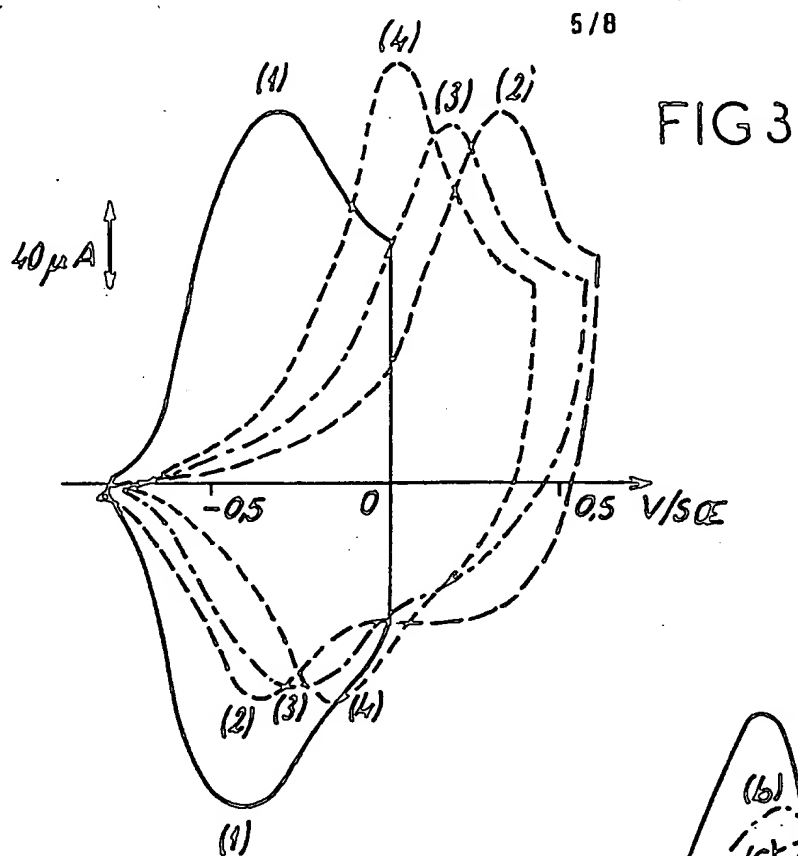
4/8

FIG2F



Py A (Phe (Hea) Pro)

(6)



6/8

FIG 5

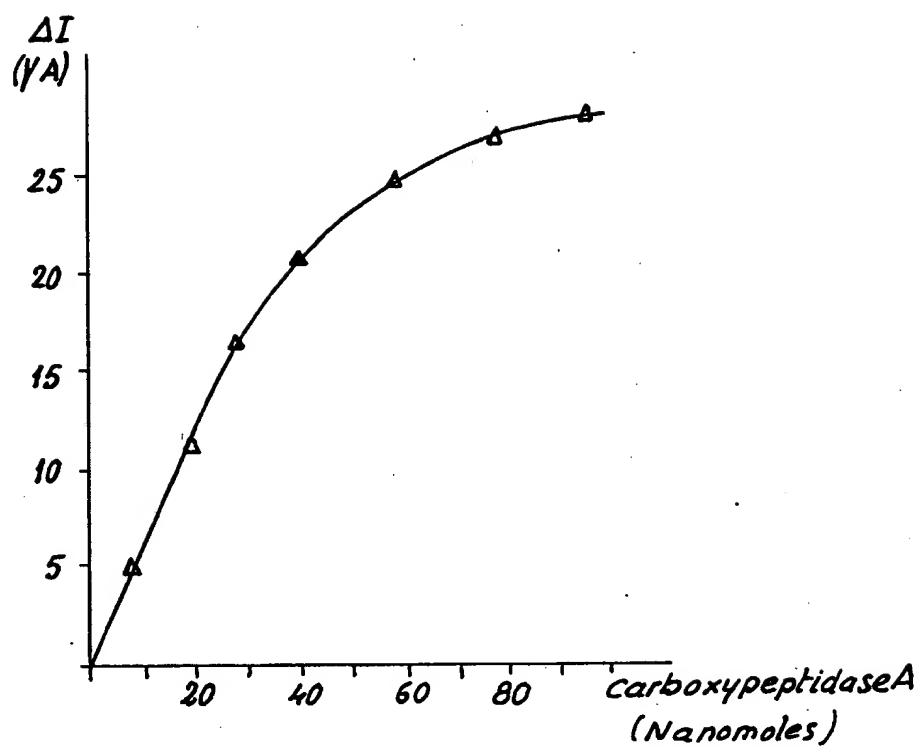


FIG 6

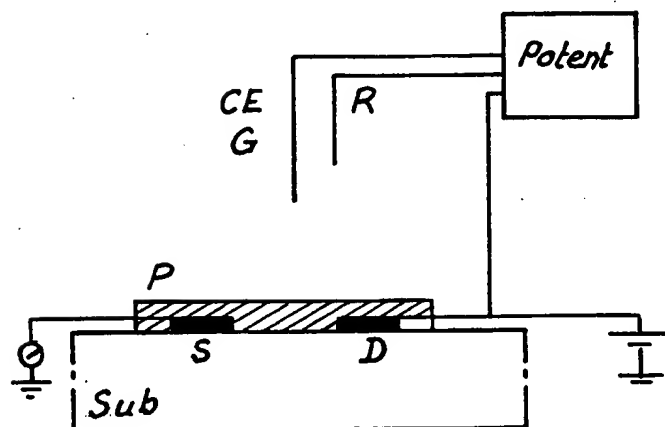


FIG 7

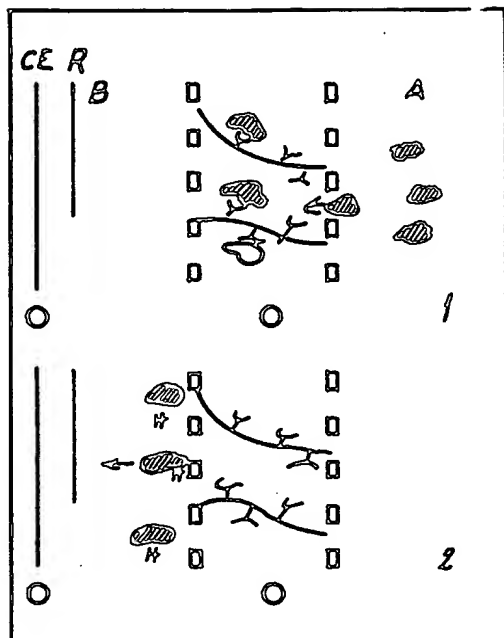


FIG 8

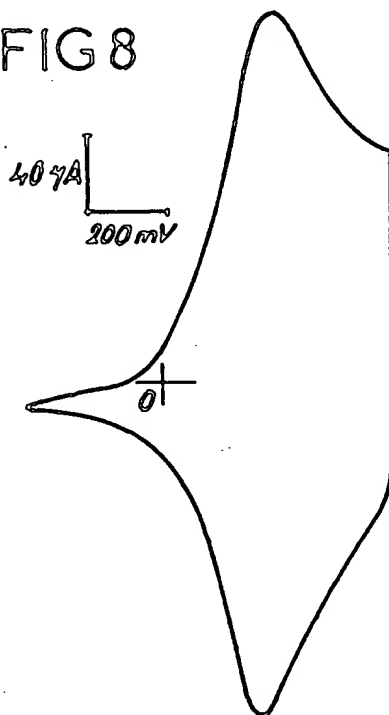


FIG 9

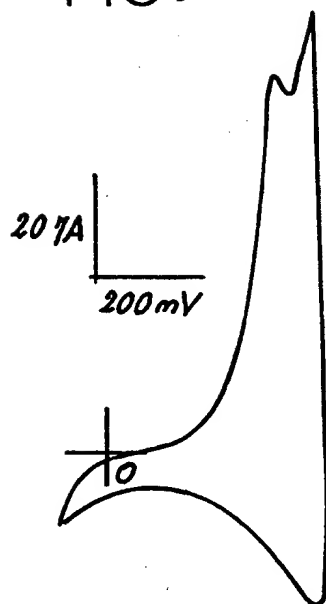
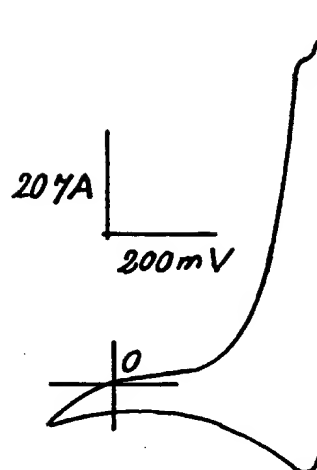


FIG 10



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR 95/00536

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 6 C08G61/12 G01N27/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C08G

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO,A,90 10655 (ALLAGE ASSOCIATES INC) 20 September 1990 see claim 1 ----	1
A	WO-A-93 06237 (ALLAGE ASSOCIATES INC) 1 April 1993 ----	
A	FR-A-2 656 868 (NIPPON OIL CO LTD) 12 July 1991 ----	
A	EP-A-0 157 326 (MILES LAB) 9 October 1985 -----	

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
 "E" earlier document but published on or after the international filing date  
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.  
 "Δ" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

1 September 1995

Date of mailing of the international search report

08.09.95

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx 31 651 epo nl,  
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Stienon, P

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 95/00536

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9010655	20-09-90	US-A- 5312762 US-A- 5352574	17-05-94 04-10-94
WO-A-9306237	01-04-93	US-A- 5312762	17-05-94
FR-A-2656868	12-07-91	JP-A- 3205422 US-A- 5149826	06-09-91 22-09-92
EP-A-0157326	09-10-85	US-A- 4657855 AU-B- 551907 AU-A- 4076985 CA-A- 1238560 JP-C- 1836652 JP-A- 60256398	14-04-87 15-05-86 10-10-85 28-06-88 11-04-94 18-12-85



## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

nde Internationale No

PCT/FR 95/00536

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
CIB 6 C08G61/12 G01N27/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C08G

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO,A,90 10655 (ALLAGE ASSOCIATES INC) 20 Septembre 1990 voir revendication 1 ----	1
A	WO-A-93 06237 (ALLAGE ASSOCIATES INC) 1 Avril 1993 ----	
A	FR-A-2 656 868 (NIPPON OIL CO LTD) 12 Juillet 1991 ----	
A	EP-A-0 157 326 (MILES LAB) 9 Octobre 1985 -----	

☐ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

## \* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent, l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent, l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"Z" document qui fait partie de la même famille de brevets

3

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
1 Septembre 1995	08. 09. 95
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentnaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016	Fonctionnaire autorisé  Stienon, P

**RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE**

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

L. n° de l'annexe internationale No

PCT/FR 95/00536

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)		Date de publication
WO-A-9010655	20-09-90	US-A-	5312762	17-05-94
		US-A-	5352574	04-10-94
-----				
WO-A-9306237	01-04-93	US-A-	5312762	17-05-94
-----				
FR-A-2656868	12-07-91	JP-A-	3205422	06-09-91
		US-A-	5149826	22-09-92
-----				
EP-A-0157326	09-10-85	US-A-	4657855	14-04-87
		AU-B-	551907	15-05-86
		AU-A-	4076985	10-10-85
		CA-A-	1238560	28-06-88
		JP-C-	1836652	11-04-94
		JP-A-	60256398	18-12-85
-----				